



(19) RU (11) 2 091 075 (13) С1
 (51) МПК⁶ А 61 К 35/74, С 12 Н 1/20//(С
 12 Н 1/20, С 12 Р 1:23, 1:46)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95111097/13, 28.06.1995

(46) Дата публикации: 27.09.1997

(56) Ссылки: 1. Авторское свидетельство СССР N 306827, кл. А 23 С 9/123, 1971. 2. Платонов А.В. Производство препаратов для животноводства на основе микроорганизмов - симбионов желудочно-кишечного тракта. - М.: ВНИИСЭНТИ, 1985. 3. Антипов В.А., Субботин В.М. Эффективность и перспективы применения пробиотиков. - Ветеринария, 1980, N 12, с. 55 - 57. 4. Патент США N 3876807, кл. С 12 N 1/20, 1975. 5. Заявка ГДР N 2329746, кл. С 12 Н 1/20, 1977. 6. Заявка Великобритании N 1431809, кл. С 6F 1976. 7. Патент РФ N 2018313, кл. С 12 Н 1/20, 1994.

(71) Заявитель:

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

(72) Изобретатель: Карпушина С.Г.,
Воронина Л.Н., Лившиц В.А., Короткова В.С.

(73) Патентообладатель:

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

(54) КОМПЛЕКСНЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ

(57) Реферат:

Использование: биотехнология, ветеринария и касается получения бактериального препарата, используемого для скармливания пушиным зверям, домашним животным (собакам), сельскохозяйственным животным и птице с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний. Сущность изобретения: комплексный бактериальный препарат энтераид П, содержит новый штамм *Lactobacillus*

acidophilus ВКПМ В-6535 (140-160 млн живых клеток/г препарата) и штамм *Enterococcus faecium* ВКПМ В-2990 (190-210 млн живых клеток/г препарата). Препарата обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к некоторым микроорганизмам и характеризуется хорошей приживаемостью входящих в него бактерий в желудочно-кишечном тракте пушиных зверей и собак. 3 табл.

RU
2 0 9 1 0 7 5
C 1

RU 2 0 9 1 0 7 5 C 1



(19) RU (11) 2 091 075 (13) C1

(51) Int. Cl. 6 A 61 K 35/74, C 12 N 1/20//C
12 N 1/20, C 12 R 1:23, 1:46

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 95111097/13, 28.06.1995

(46) Date of publication: 27.09.1997

(71) Applicant:
Gosudarstvennyj nauchno-issledovatel'skij
institut genetiki i selektsii promyshlennnykh
mikroorganizmov

(72) Inventor: Karpushina S.G.,
Voronina L.N., Livshits V.A., Korol'kova V.S.

(73) Proprietor:
Gosudarstvennyj nauchno-issledovatel'skij
institut genetiki i selektsii promyshlennnykh
mikroorganizmov

(54) COMPLEX BACTERIAL PREPARATION FOR TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF GASTROENTERIC DISEASE IN ANIMALS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, veterinary science.
SUBSTANCE: preparation has new strain Lactobacillus acidophilus VKPM B-6535 (140-160 million live cells/g) and strain Enterococcus faecium VKPM B-2990 (190-210 million live cells/g). Preparation shows the

enhanced antagonistic activity with respect to some microorganisms and good adaptivity of microbes in gastroenteric tract of fur animals, agriculture animals and poultry.
EFFECT: enhanced effectiveness of preparation. 3 tbl

RU 2 091 075 C1

RU 2 091 075 C1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и, в частности к получению бактериального препарата, используемого для скармливания пушным зверям, домашним животным (собакам), сельскохозяйственным животным и птице с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний.

Известны различные бактериальные препараты (пробиотики), предназначенные для профилактики и лечения диареи и диобактериозов, а также стимуляции роста и развития молодняка сельскохозяйственных животных. Пробиотики могут содержать только один бактериальный штамм, или же в их состав могут быть включены несколько, вплоть до восьми различных штаммов и видов бактерий. Тенденция к созданию мульти-штаммовых препаратов объясняется тем, что они активны в более широком диапазоне условий и видов животных. В настоящее время в пробиотики включают главным образом штамм кишечного происхождения таких видов, как *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* и *Bifidobacterium* spp. Кроме того, могут применяться и культуры, выделенные из кисломолочных продуктов, например, *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*. Почти все пробиотики, пользующиеся сейчас спросом, содержат лактобациллы и/или стрептококки; немногие содержат бифидобактерии.

Примером пробиотического препарата, в состав которого входит один штамм, является ацидофилин, содержащий в 1 г не менее 200 млн ацидофильных бактерий *Lactobacillus acidophilus* [1]. Среди комплексных пробиотических препаратов можно отметить пропионицид, который содержит ацидофильные лактобациллы и пропионовокислые бактерии [2]. Описан препарат, который содержит антибиотикустойчивые штаммы молочнокислых бактерий *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus* и *S. lactis* [3]. Он предназначен для восстановления и поддержания равновесия кишечной флоры животных, нарушенного в результате применения антибактериальных средств. Известно несколько пробиотических препаратов, в состав которых входят культуры *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus* и *S. thermophilus* [4, 5].

Известен также комплексный микробный препарат СБА для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний животных, выбранный нами в качестве ближайшего аналога [7]. Согласно описанию, он содержит *L. acidophilus*, *S. faecium* и *Bifidobacterium bifidum*. Препарата используют для лечения сельскохозяйственных животных и птицы. Недостаток препарата СБА заключается в том, что он имеет недостаточно широкий диапазон антимикробного действия и обладает невысокой антагонистической активностью (табл. 1). Кроме того, при его наработке получаются недостаточно высокие выходы составляющих его культур, а также невозможно использование мелассы, которая является дешевым источником углерода в промышленных средах при получении препарата.

Задачей настоящего изобретения

является создание бактериального препарата для пушных зверей, домашних животных (собак), сельскохозяйственных животных и птицы с более широким диапазоном антимикробного действия и более высокой антагонистической активностью.

Задача решается получением комплексного бактериального препарата энтерацид П, содержащего новый штамм *Lactobacillus acidophilus* 495 и штамм *Enterococcus faecium* ВКПМ В-2990 (штамм получен из Музея культур промышленных микроорганизмов ГНИИгенетика).

Штамм *Lactobacillus acidophilus* 495 был выделен из содержимого кишечника лесца.

Идентификация штамма проводилась по основным морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим свойствам, согласно определителю Берджи [8].

Штамм *Lactobacillus acidophilus* 495 депонирован во Всероссийской коллекции культур промышленных микроорганизмов ГНИИгенетика под номером ВКПМ В-6535 и характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки.

Клетки в виде тонких прямых палочек с тульми концами, расположенные поодиночке или в цепочках. Неподвижные, грамположительные, спор и капсул не образуют, жгутиков не имеют.

Культуральные признаки.

Растет на богатых питательных средах, содержащих органические компоненты. При росте на гидролизованном молоке или среде МРС через 12 часов наблюдается равномерное помутнение. На плотной среде МРС колонии выпуклые, непрозрачные, беловатые, обычно шероховатые, но становятся гладкими и плотными в присутствии твина-80. На агаре с молочной сывороткой образуют поверхностные колонии диаметром 2-3 мм и глубинные колонии в виде комочек ваты.

Физиолого-биохимические признаки.

Катализонегативен. Факультативный анаэроб. При расщеплении сахаров не менее половины конечных углеродных продуктов составляет молочная кислота. Не образует пигмента. Растет при pH 5,0-6,8. Оптимальная температура роста культуры 37-39°C, максимальная 45°C, минимальная 20°C. Обладает сложными пищевыми потребностями в аминокислотах, пептидах, производных нуклеиновых кислот, витаминах, солях жирных кислот или их эфирах и сбраживаемых углеводах. Не разжижает желатину. Не образует газа из глюкозы или глюконата.

Хорошо сбраживает молоко, образуя плотный ровный сгусток с приятным кисломолочным запахом и вкусом. Титруемая кислотность суточной культуры составляет 110°Т, предельная титруемая кислотность при 37°C - 300°Т.

Отношение к углеводам.

Сбраживает аскулин, фруктозу, галактозу, глюкозу, лактозу, мальтозу, маннозу, раффинозу, салицин, сахарозу, трегалозу; не сбраживает ксилозу, рибозу, сорбит, рамнозу, мелибиозу, мелазитозу, маннит, целлобиозу, арабинозу, амигдалин.

Штамм растет в бульоне в присутствии 2% NaCl, но не 4% NaCl. Штамм устойчив в желчи в концентрации 40% в среде. Свертывает молоко с 0,5% фенола.

RU 2091075 C1

C1 2091075 RU

Антагонистическая активность культуральной жидкости штамма (ЮЧ), полученной при его культивировании в MRS-бульоне [8] в течение 24 ч, выявлена как по отношению к грамположительным, так и к грамотрицательным бактериям: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella abortus-bovis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Сравнительная характеристика антимикробной активности штамма *Lactobacillus acidophilus* 495 и штамма *Lactobacillus acidophilus*, выделенного из препарата СБА (*Lactobacillus acidophilus* СБА), по отношению к некоторым тест-культурям приведена в таблице 1.

Продуктивность штамма.

При культивировании штамма на обезжиренном молоке в течение 14 ч титр клеток составляет 2-4 млрд/мл, а в ферментационной среде 3-5 млрд/мл.

При проверке штамма *Lactobacillus acidophilus* 495 на белых мышах установлена его непатогенность.

Штамм хранят в лиофильно-высушенном состоянии или путем периодических пересевов (1 раз в 30 дн) на стерильном обезжиренном молоке. В этом случае посевы инкубируют при 37-39°C в течение 18-24 ч.

Предлагаемый штамм *Lactobacillus acidophilus* 495 обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к некоторым грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам (табл. 1) и дает более высокие титры, т.е. имеет более высокую продуктивность по сравнению с использовавшимися ранее штаммом *Lactobacillus acidophilus* из препарата СБА (табл. 2). Штамм *Lactobacillus acidophilus* 495 обладает также таким преимуществом, как способность сбраживать сахарозу, которая отсутствует у штамма *Lactobacillus acidophilus* из СБА. Благодаря этому можно эффективно использовать в составе ферментационной питательной среды для его культивирования в качестве источника углерода свекловичную мелассу, которая значительно дешевле глюкозы.

Комплексный бактериальный препарат, полученный с использованием предлагаемого штамма, характеризуется хорошей приживаемостью лактобацилл в желудочно-кишечном тракте пушных зверей и собак, очевидно, в связи с видоспецифичностью штамма *Lactobacillus acidophilus* 495 (табл. 3).

Получение комплексного бактериального препарата энтерацид П включает следующие этапы: приготовление питательной среды для раздельного выращивания составляющих его культур, получение инокулята, приготовление посевного материала, накопление бактериальной массы, отделение бактериальной массы от культуральной жидкости, приготовление защитной среды, смешивание бактериальной массы с защитной средой, замораживание, сушка супензии сублимацией (или распылительное высушивание культуральной жидкости), измельчение сухих порошков биомассы, смешивание культур-компонентов, стандартизация препарата, упаковка,

маркировка.

Пример 1. С целью получения комбинированного бактериального препарата энтерацид П проводят раздельное выращивание культур *Lactobacillus acidophilus* 495 и *Enterococcus faecium* ВКПМ В-2990 на посевной питательной среде следующего состава,

Кукурузная мука 3

Кукурузный экстракт 0,9

Глюкоза 1,5 (или меласса свекловичная 1,5 по РВ)

Мел химически осажденный 0,5

Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный 0,02

Калий фосфорнокислый однозамещенный 0,02

Натрий взятнокислый 0,03

Кобальт хлористый 6-водный 0,0005

Марганец сернокислый 5-водный 0,0005

Натрий молибденовокислый 0,0005

Цинк сернокислый 7-водный 0,0005

Водопроводная вода до 100.

Глюкозу и мелассу стерилизуют отдельно в автоклаве: глюкозу в виде раствора с конц. 400 г/л при давлении 0,05 МПа с выдержкой в течение 30 мин; мелассу в виде раствора с конц. 500 г/л при 0,08 МПа с выдержкой 40 мин. Остальные компоненты среды стерилизуют совместно. Значение pH питательной среды до стерилизации устанавливают 7,2-7,3; после стерилизации 7,0-7,2. Засев среды производят в асептических условиях.

Инокулят получают на обрате путем культивирования монокультур при 37-39°C в течение 18-20 ч до образования плотного ровного сгустка. Инокулят используют для получения посевного материала. С этой целью инокулят в количестве 3-5% вносят в питательную среду. После засева и перемешивания величина pH должна составлять 5,5-6,0. Выращивание посевного материала для каждого штамма ведут в анаэробных условиях при температуре (39±1)°C и избыточном давлении 0,02-0,04 МПа. Выращивание ведут в течение 10-14 ч.

Посевной материал используют для засева ферментационной питательной среды. Его вносят в количестве 3% от объема среды. После засева и перемешивания величина pH должна составлять 5,5-6,0. Культивирование каждого штамма ведут в анаэробных условиях при температуре (39±1)°C и избыточном давлении 0,02-0,04 МПа. Продолжительность выращивания каждой культуры 10-14 ч. К концу срока выращивания количество жизнеспособных клеток составляет: при выращивании энтерококка не менее 500 млн/мл, при выращивании лактобацилл не менее 400 млн/мл; pH культуральной жидкости снижается до значения 4,0-4,5; содержание сухих веществ составляет 4,8-5,2%.

После этого, полученную культуральную жидкость с pH 4,0-4,5 подщелачивают до pH 5,8-6,0 40% раствором едкого натра, затем добавляют в нее при перемешивании компоненты, служащие защитной средой при последующей сушке: мелассу в количестве 15 г/л и кукурузную муку в количестве 50 г/л, после чего культуральную жидкость перемешивают в течение 15-20 мин.

Сушку обработанной культуральной жидкости энтерококка или ацидофильных

R U 2 0 9 1 0 7 5 C 1

бактерий производят в распылительной сушилке. Режим сушки: температура воздуха на входе 130-135°C, на выходе 60-65°C.

Стандартный препарат энтерацид П получают путем смешивания сухих порошкообразных продуктов культур *Enterococcus faecium* и *Lactobacillus acidophilus*, полученных после распылительной сушки, с наполнителем - высушенной кукурузной мукою. Кукурузную муку сушат в сушильном шкафу при температуре 70-80°C в течение 20-30 мин до влажности 4-6%.

Полученный комплексный микробный препарат энтерацид П имеет следующую характеристику: мелкий сухой порошок от кремового до светло-коричневого цвета со специфическим запахом и вкусом, нерастворимый в воде, содержащий живые клетки штаммов:

Lactobacillus acidophilus 495 140 160 млн/г,
Enterococcus faecium ВКПМ В-2990 190 210 млн/г.

Пример 2. Культуральные жидкости ацидофильных бактерий и энтерококка кишечного происхождения, полученные по описанному в примере 1 способу, подвергают сепарированию, а выделенную биомассу сублимационной сушке.

Перед сепарированием культуральную жидкость подщелачивают до pH 5,8-6,0 40% раствором едкого натра, затем охлаждают при перемешивании до температуры 18-20°C. Во время сепарирования производят постоянное захолаживание культуральной жидкости.

По окончании сепарирования полученный осадок биомассы, представляющий собой пасту желто-коричневого цвета, смешивают с защитным раствором в соотношении 1 л раствора на 1 кг биомассы. Для получения однородной массы смесь перемешивают в течение 20-25 мин. В качестве защитного раствора используют раствор трехзамещенного 5,5-водного лимоннокислого натрия (50 г/л) и мелассы (15 г/л). Раствор готовят на водопроводной воде, стерилизуют его в автоклаве при давлении 0,05 МПа с выдержкой в течение 1 ч и охлаждают до комнатной температуры.

Полученную сметанообразную суспензию направляют на сублимационную сушку. Продолжительность сушки составляет 25-30 ч; процесс оканчивают, когда остаточное давление в камере уменьшения до 0,1 мбар, а температура материала достигает (22±3)°C, остаточная влажность материала не

превышает при этом 5%. Полученные сухие продукты измельчают до порошкообразного состояния на лабораторной мельнице, в которую каждый продукт (по отдельности) загружают порциями и размалывают в течение 15-20 мин.

Стандартизованные препараты получают путем смешивания сухих порошкообразных продуктов культур *Enterococcus faecium* и *Lactobacillus acidophilus*, полученных после сублимационной сушки, с наполнителем - высушенной кукурузной мукою. Содержание живых клеток в стандартизованных препаратах составляет:

Lactobacillus acidophilus 495 140 160 млн/г
Enterococcus faecium ВКПМ В-2990 190 210 млн/г.

Использованная литература.

1. Авторское свидетельство СССР N 306827, опубл. 1971.

2. Платонов А. В. Производство препаратов для животноводства на основе микроорганизмов-сymbионтов желудочно-кишечного тракта. М. ВНИИСЭНТИ, 1985, 43 с.

3. Антипов В. А. Субботин В.М. Эффективность и перспективы применения пробиотиков //Ветеринария. 1980, N 12, с. 55-57.

4. Патент США N 3876808/

5. Патент ФРГ N 2329746.

6. Патент Великобритании N 1431809.

7. Патент РФ N 2018313, кл. C 12 N 1/20, 1994.

8. Kandler O. Weiss N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212 AL / Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, v. 2 / Eds. Smith P.H.A. Mair N.S. Sharpe M. E. Holt J.G. Baltimore, London, Los Angeles, Sidney: Williams and Wilkins, Inc. 1986, pp. 1209-1234.

Формула изобретения:

Комплексный бактериальный препарат для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний животных, содержащий молочно-кислые бактерии *Lactobacillus acidophilus* и *Enterococcus faecium*, отличающийся тем, что он из вида *Lactobacillus acidophilus* содержит штамм *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-6535, а из вида *Enterococcus faecium* штамм *Enterococcus faecium* ВКПМ В-2990 при следующем соотношении компонентов, млн. живых клеток/г препарата:

Lactobacillus acidophilus ВКПМ В-6535 140 160

Enterococcus faecium ВКПМ В-2990 190 210a

55

60

-5-

R U 2 0 9 1 0 7 5 C 1

Таблица 1

Подавление роста тест-культур культуральной жидкостью (ЮК) штаммов *L. acidophilus* 495 и *L. acidophilus* СБА, выращенных в среде MRS [8] в течение 24 ч, а также ЮК препаратов энтерацида П и СБА

Тест-культуры	Диаметр зон задержки роста тест-культур, мм			
	ЮК <i>L. acidophilus</i> 495	ЮК <i>L. acidophilus</i> СБА	ЮК энтерацида П	ЮК СБА
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	14	16	13
<i>Micrococcus luteus</i>	33	32	31	24
<i>Bacillus subtilis</i>	30	27	14	11
<i>Escherichia coli</i>	19	14	20	15
<i>Salmonella typhimurium</i>	16	13	14	11
<i>Salmonella abortus-bovis</i>	20	14	18	16
<i>Salmonella dublin</i>	16	14	17	13
<i>Salmonella gallinarum</i>	12	0	14	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	16	0	12	0
<i>Streptococcus sanguis</i>	16	15	14	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	0	13	10

Таблица 2

Титры штаммов *Lactobacillus acidophilus* 495 и *Lactobacillus acidophilus* СБА в колониебобразующих единицах (КОЕ), полученные в различных условиях.

Штамм	КОЕ			Выход биомассы, кг/л ЮК
	В 1 мл обрата	В 1 мл культуральной жидкости (ЮК)	В 1 г сухого препарата	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 495	1,5-2,0·10 ⁸	3,0-6,0·10 ⁹	0,5-1,5·10 ⁸	0,09-0,11
<i>Lactobacillus acidophilus</i> СБА	0,3-0,5·10 ⁸	0,1-1,5·10 ⁹	0,1-0,7·10 ⁸	0,07-0,08

Таблица 3

Сравнительная эффективность применения энтерацида П и СБА для норок и собак

Показатели	Контрольная группа животных (в рацион включен СБА)	Опытная группа животных (в рацион включен энтерацид П)
1. Количество животных:		
- норки	16000	16000
- собаки	186	173
2. Доза препарата, г/кг массы животного	0,2	0,2
3. Продолжительность применения препарата, дней:	2 раза в сутки	2 раза в сутки
- норки	50	50
- собаки	30	30
4. Сохранность животных, %:		
- норки	90,4	95,7
- собаки	88,6	95,4
5. Пало животных, %		
- норки	9,6	4,3
- собаки	11,4	4,6

RU 2091075 С1

С1 2091075 RU

English translation of extracts from RU 2091075

<.....>

At the present time probiotics include a strain of intestinal origin of such species as *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L.helveticus*, *L.lactis*, *L.salivarius*, *L.plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *E.faecium* and *Bifidobacterium* spp.

<.....>

Claims

Complex bacterial preparation for treatment and prophylaxis of gastrointestinal disorders in animals comprising lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Enterococcus faecium* characterized in that it comprises *Lactobacillus acidophilus* strain VKPM B-6535 and *Enterococcus faecium* strain VKPM B-2990 to the amount of *Lactobacillus acidophilus* strain VKPM B-6535 of 140-160 million live cells per gram of the preparation and of *Enterococcus faecium* strain VKPM B-2990 of 190-210 million live cells per gram of the preparation.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.